

ЦИНК- ИЛИ МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫЕ ПОКРЫТИЯ ТОРМОЗЯТ IN VITRO РОСТ ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ

И.А. Хлусов^{1,2}, М.Р. Карпова¹, Л.С. Муштоватова¹, О.С. Жданова¹,
Ю.П. Шаркеев^{2,3}, Д.В. Митриченко⁴, А.Б. Просолов⁴, А.Р. Комков⁵, В.И. Рудаев⁵,
Е.Г. Комарова³, М.Б. Седельникова³, Л.С. Литвинова⁶, М.В. Чайкина⁷

¹Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

E-mail: khlusov63@mail.ru

²Томский политехнический университет, г. Томск

³Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск

⁴ООО «НПК «СИНТЕЛ», г. Томск

⁵Городская клиническая больница № 2, г. Кемерово

⁶Балтийский федеральный университет имени И. Канта, г. Калининград

⁷Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, г. Новосибирск

Введение

Перипротезная инфекция (ППИ) является профессиональным вызовом для хирургов (2–37 % осложнений при ортопедических и травматологических манипуляциях имеют инфекционную природу), резко увеличивает стоимость лечения, создает огромную социальную нагрузку, снижает качество и сокращает длительность жизни пациентов.

Staphylococcus aureus (SA) – типичный представитель патогенных стафилококков, вызывает местные и системные поражения, в том числе, инфекции опорно-двигательного аппарата, остеомиелит, артриты [1]. Для имплантологии важным представляется его активное заселение в эндопротезы суставов, поскольку существует высокая адгезивная способность микроорганизма к искусственным поверхностям [2], включая кальцийфосфатные (КФ) покрытия [3].

В 2012–2103 гг. Международная согласительная конференция с участием специалистов из 52 стран мира констатировала факт, что надежных и универсальных инструментов профилактики и лечения ППИ до сих пор не существует. При этом перспективными для борьбы с ППИ до сих пор считаются ионы металлов с антимикробным потенциалом (серебро, медь, цинк), сохраняющимся при стерилизации медицинских изделий.

В связи с этим было изучено влияние цинк- или медьсодержащих кальцийфосфатных покрытий на титане или титан-ниобиевом сплавах на рост SA in vitro.

Материалы и методы эксперимента

Применяли образцы размером 10×10×1 мм³, несущие двустороннее покрытие из фосфатов кальция. Покрытие формировали на подложке из коммерчески чистого титана либо сплава титан-40 массовых % ниобия (Ti–40Nb) методом микродугового оксидирования на установке Microarc-3.0 (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск) в анодном режиме. Электролит состоял из водного раствора ортофосфорной кислоты (20 мас. %), карбоната кальция (9 мас. %) и синтетического гидроксиапатита (6 мас. %). Порошок синтетического гидроксиапатита с диаметром частиц 40–100 нм, в том числе, с замещением кальция на медь или цинк (Ca_{10-x}Zn_x(PO₄)₆(OH)₂ или Ca_{10-x}Cu_x(PO₄)₆(OH)₂, x = 0,1), получен механохимическим способом, как описано ранее [4].

Исследование элементного состава поверхности образцов (индекс шероховатости $R_a = 2\text{--}5$ мкм) осуществляли на сканирующем электронном микроскопе Quanta 200 ESEM FEG с EDX-анализатором (FEI, Нидерланды). Концентрация антимикробных элементов в КФ покрытии составила 0,18–0,36 атомных % Zn или 0,06–0,16 атомных % Cu.

Образцы стерилизовали в сухожарочном шкафу при 180 °С в течение 60 мин. Экстракты образцов с КФ покрытием получали с помощью синтетической культуральной среды RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) с низким содержанием микроэлементов через 7 дней при температуре 37 °С (2 мл среды на каждый образец согласно рекомендациям ГОСТ ИСО 10993-5).

Эксперименты *in vitro* проводили на патогенном штамме 209 SA из коллекции кафедры микробиологии Сибирского государственного медицинского университета (Томск), который по паспорту характеризуется типичными морфологическими, биохимическими, гемолитическими и плазмокоагулирующими свойствами.

В стерильных условиях в 15 мл центрифужных пластиковых пробирках по стандарту мутности готовили микробную взвесь (500 микробных тел) с экстрактом или растворителем (0,9 % раствор хлорида натрия или среда RPMI-1640) в соотношении 1:1, инкубировали в течение 2 ч при 37 °С.

Затем по 200 мкл взвеси из каждой группы (100 микробных тел) помещали на питательную агаровую среду (ПАС) БТН-агар (ООО «Биотехновация», Электрогорск) в 90-мм пластиковых чашках Петри, втирали в течение 2 мин в агар, культивировали 24 часа при 37 °С. На каждую группу брали по 3 чашки Петри. ПАС и растворители без микробной взвеси не показали роста колоний, что подтвердило их стерильность.

Результаты обрабатывали с применением программы «STATISTICA for Windows 10.0». Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), 25 % квартиль (Q_1) и 75 % квартиль (Q_3). Для оценки статистической значимости различий применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (U-тест, P_U). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для микробной клетки гибель означает необратимую потерю способности к репродукции (росту и делению). Она считается погибшей, если не в состоянии образовывать колонию (клон дочерних клеток) на твердой питательной среде [1].

Устойчивость клеток к повреждающим факторам увеличивается в полноценной питательной среде, богатой необходимыми факторами для роста и репарации повреждений (ростовые факторы, минералы, физико-химические условия культивирования). SA штамм 209 хорошо рос на ПАС, образуя в зависимости от концентрации посеянных клеток и свойств среды до 3 колоний на 1 мм² или 30–60 колоний на 1 см² поверхности чашки Петри. Размер колоний микробов, происходящих из одной колониобразующей единицы (КОЕ), достигал 0,5–1 мм² (рис. 1, табл. 1).

Колонии правильной формы (S-типа) с золотистым пигментом (рис. 1). Несмотря на угрозу сливного роста, исследования на больших бактериальных популяциях более информативны для изучения антимикробных агентов, поскольку такие популяции ингибируются в меньшей степени, чем малые. Кроме того, увеличивается вероятность появления резистентных к воздействию мутантов [1].

Значительное количество выросших на агаре КОЕ затруднило их подсчет из-за слияния отдельных колоний в конгломераты (например, рис. 1, б). Для выявления возможного влияния тестируемых экстрактов на рост SA был использован метод компьютерной морфометрии оптической плотности (плотности распределения колоний) куль-

тур микробов по их способности поглощать/отражать видимый свет согласно статистике серых уровней [5].

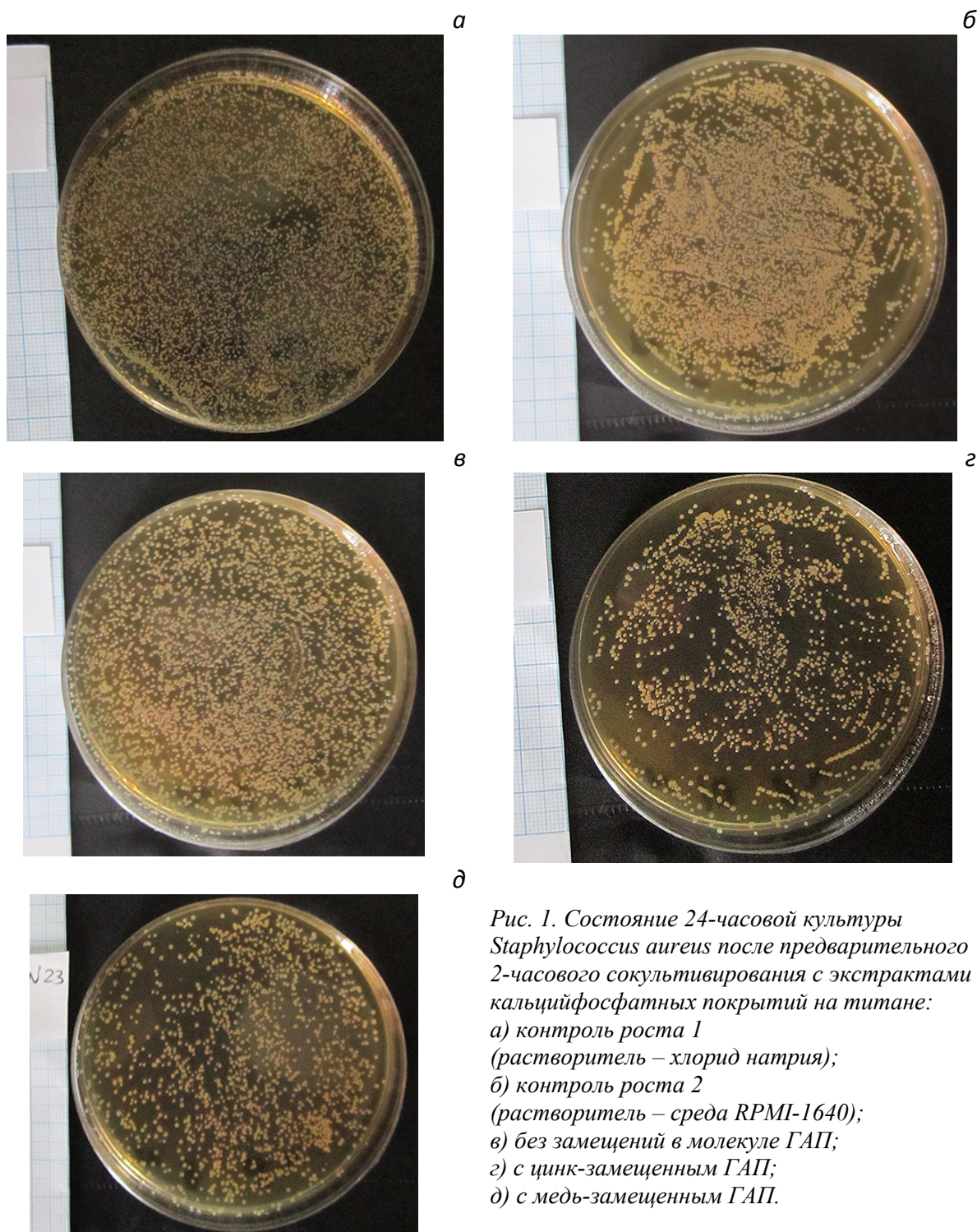


Рис. 1. Состояние 24-часовой культуры *Staphylococcus aureus* после предварительного 2-часового сокультивирования с экстрактами кальцийфосфатных покрытий на титане:
 а) контроль роста 1 (растворитель – хлорид натрия);
 б) контроль роста 2 (растворитель – среда RPMI-1640);
 в) без замещений в молекуле ГАП;
 г) с цинк-замещенным ГАП;
 д) с медь-замещенным ГАП.

Результаты показали (табл. 1), что экстракты КФ покрытий без добавок антимикробных микроэлементов, вне зависимости от состава металлической подложки, достоверно увеличивали D культуры SA, что свидетельствует об усилении роста микроорганизма на ПАС (рис. 1, в).

В свою очередь, введение в состав КФ покрытий Zn или Cu уменьшало выход микробных КОЕ (рис. 1, з, д), что приводило к существенному падению D (табл. 1), в большей степени, при использовании экстрактов образцов на титановой подложке.

Таблица 1. Результаты 24-часового роста Staphylococcus aureus штамм 209 в агаровой среде после предварительного 2-часового сокультивирования с экстрактами кальцийфосфатных покрытий на металлических подложках, Me(Q1-Q3), P_u

№ пп	Группа наблюдений, n=3	Титановая подложка			Титан-ниобиевая подложка		
		Оптическая плотность (D) культуры мик- робов (по моду- лю), у.е.о.п.	Число коло- ний на 1 мм ²	Диаметр колоний, мм	Оптическая плотность (D) культуры мик- робов (по моду- лю), у.е.о.п.	Число коло- ний на 1 см ²	Диаметр коло- ний, мм
1	Контроль роста 1	56,4 (55,9–56,7)	0–3	до 0,5	77,7 (77,6–77,8)	30–60	до 1
2	Контроль роста 2	63,0* (63–63,1)	–	до 0,5	75,3* (75,1–75,5)	–	до 1
3	Экстракты КФ покрытий	64,25 ^{&} (64,2–64,3)	–	до 0,5	78,0 ^{&} (77,9–78,1)	–	до 1
4	Экстракты КФ-Zn покрытий	38,3 ^{&} (37,7–38,7)	–	до 0,5	77,25 ^{&} (77,2–77,3)	–	до 1
5	Экстракты КФ-Cu покрытий	46,4 ^{&} (46,3–46,5)	–	до 0,5	72,2 ^{&} (72,1–72,3)	–	до 1

*Примечание: микробные клетки отражают свет, поэтому значения D имеют отрицательный знак; n – число изученных чашек Петри в каждой группе; *) – статистические различия (P_u < 0,05) с группой 1, & – с группой 2 согласно U-критерию Манна-Уитни.*

Выводы

По антимикробной активности в отношении Staphylococcus aureus штамм 209 тестируемые жидкости можно расположить следующим образом: КФ-Cu, КФ-Zn > среда RPMI-1640, 0,9 % раствор хлорида натрия > КФ.

Предлагаемая разработка и продукты на ее основе позволяют надеяться на уменьшение частоты и риска ППИ и повышение интеграции медицинских изделий с костной тканью.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект 15-03-07659).

Список литературы

1. Джавец Э., Мельник Дж.Л., Эйдельберг Э.А. Руководство по медицинской микробиологии / пер. с англ. – Т. 2. – М.: Медицина, 1982. – 384 с.
2. Dougherty S.H. Implant infections // Handbook of biomaterials evaluation / ed. A.F. von Recum. – N.Y., Toronto, London, 1986. – P. 276–289.
3. Карлов А.В., Хлусов И.А., Понтан В.А., Игнатов В.П., Ивин М.А., Зинатулина С.Ю. Адгезия Staphylococcus aureus к имплантатам с различными физико-химическими свойствами // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2002. – № 9. – С. 322–325.
4. Chaikina M.V., Uvarov N.F., Ulihin A.S., Khlusov I.A. Mechanochemical synthesis of nanosized functional materials with the apatite-type structure. Problems of Materials Science. 2008; 54 (2): 219–32.
5. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / под ред. В.В. Новицкого, В.П. Шахова, И.А. Хлусова. – Томск: STT, 2004. – 386 с.